



Návod na použitie Biofortuna SSPGo™ HLA Wipe Test BF-40-01

Verzia 2

September 2011

1. Použitie

Biofortuna SSPGo HLA Wipe Test sa používa na monitorovanie laboratórných priestorov a vybavenia na kontamináciu PCR amplikónmi, ktorá môže vzniknúť pri použití produktov Biofortuna SSPGo.

2. Úvod

PCR je senzitívna technika, ktorá je náchylná na kontamináciu DNA amplikónom z predchádzajúcej PCR. Kontaminácia môže viesť k falošne pozitívnej amplifikácii v nasledujúcich PCR, čoho následkom môže byť nesprávna genotypizácia. PCR amplikón môže kontaminovať reagentie a vzorky, a tiež laboratórne vybavenie, ako napríklad pipety. Známkou kontaminácie reagentií a vybavenia je potrebné pravidelne monitorovať.

3. Popis testu

Každý SSPGo HLA Wipe Test sa skladá zo stripu s ôsmimi PCR jamkami obsahujúcimi lyofilizovaný PCR pufer, polymerázu a priméry špecifické pre HLA-DRA gén, ktorého produktom je amplikón s veľkosťou 187 bp z ľudskej genomickej DNA. Keďže všetky súpravy firmy Biofortuna využívajú ako internú kontrolu DRA amplikón, akákoľvek kontaminácia spôsobená použitím kitov Biofortuna SSPGo bude mať amplifikáciu DRA génu a bude detegovaná primérmi wipe testu.

Každý strip s ôsmimi jamkami otestuje na kontamináciu maximálne tri testované zóny. Každý strip obsahuje pozitívnu a negatívnu kontrolnú reakciu, ako aj kontrolné inhibičné reakcie pre každú testovanú zónu. Pri testovaní na kontamináciu sa miesto najprv otrie vatovou tyčinkou a tá sa namočí do vody. Voda sa použije ako templát wipe testu a ako zmes 50 : 50 s genomickou DNA ako inhibičný test PCR.

Odporúča sa robiť testy na kontamináciu pravidelne. Medzi zvyčajne testované miesta by mali patriť: oblasti prípravy DNA, PCR a oblasť po amplifikácii. Medzi zvyčajne testované vybavenie by mali patriť: pracovné pulty, pipety, centrifúgy, rúčky na chladničke a mrazničke, kľučky na dverách a stojany. Medzi zvyčajne testované roztoky by mali patriť: pufre na prípravu DNA a roztoky na riedenie DNA. Reagentie používané spoločne na viacero účelov, ako napr. PCR pufer a *Taq* polymeráza sú obzvlášť náchylné na kontamináciu, ale nemajú vplyv na súpravy Biofortuna, pretože tie sú dodávané ako celok a vyžadujú len prídanie DNA.

4. Obsah súpravy

- 12 stripov každý s 8 PCR jamkami a každá jamka obsahuje 10 µl dopredu nadávkovaných lyofilizovaných primérov, polymerázu, dNTP* a pufer. Každý vo fólii zabalený strip je určený na testovanie troch zón na kontamináciu. Formát stripu s ôsmimi reakciami je uvedený nižšie.

Reakcia	Farbivo	Použitie
1	Červené	Pozitívna kontrola: DNA
2	Fialové	Negatívna kontrola: voda použitá na namočenie vatovej tyčinky
3	Modré	Zóna 1 inhibičný test: 50 % DNA, 50 % voda z wipe testu
4	Fialové	Zóna 1 wipe test
5	Modré	Zóna 2 inhibičný test: 50 % DNA, 50 % voda z wipe testu
6	Fialové	Zóna 2 wipe test
7	Modré	Zóna 3 inhibičný test: 50 % DNA, 50 % voda z wipe testu
8	Fialové	Zóna 3 wipe test

- 36 sterilných vatových tyčienok
- 12 x 8 PCR uzávery
- 1 x návod na použitie
- 1 x šaržový certifikát vydaný výrobcom (Certificate of Analysis)
- Karty bezpečnostných údajov (MSDS) možno získať z webovej stránky spoločnosti Biofortuna www.biofortuna.com. Ak nemáte možnosť získať ich z webovej stránky, kontaktujte prosím distribútora.

*CleanAmp™ dNTP podliehajú licencií spoločnosti Trilink Biotechnologies Inc so zvoľením na použitie v produktoch Biofortuna SSPGo.



5. Reagencie a vybavenie, ktoré nie sú súčasťou dodávky

- Vhodné pipety a sterilné špičky, napr. pipeta P10 s 10µl filtračnými špičkami.
- Ľudská genomická DNA s koncentráciou 5 – 10 ng/µl, ktorá bude použitá ako pozitívna kontrola.
- Súprava/vybavenie na izoláciu DNA.
- UV spektrofotometer.
- 2ml polypropylénové skúmavky.
- Sterilná voda s pre molekulárno-biologické aplikácie.
- Termocyklér s 96 jamkami a vyhrievaným vekom. Platničky a skúmavky PCR použité v kitoch spoločnosti Biofortuna boli validované pre použitie s väčšinou termocyklérov na trhu, vrátane termocyklérov MJ Research PTC-100, PTC-200, Hybaid MBS a Techne TC-512. Iné modely môžu vyžadovať ďalšiu validáciu užívateľom.
- Reagencie pre gélovú elektroforézu (agaróza, 0,5x TBE pufer, 1 000bp DNA marker molekulevej hmotnosti, roztok etídiumbromidu 10 mg/ml).
- Vybavenie pre gélovú elektroforézu (gélová aparátúra, sieťový zdroj, dokumentačný systém pre gél s UV transiluminátorom).

6. Bezpečnosť a varovania

- Testy musí vykonávať iba náležite vyškolený personál.
- So všetkými vzorkami zaobchádzajte v súlade so zásadami Správnej laboratórnej praxe.
- Oblasti, kde sa vykonáva postup pred a po PCR musia byť oddelené. Žiadny materiál používaný po PCR nevnášajte späť do oblasti pred PCR.
- **Varovanie týkajúce sa biologického rizika:** So všetkými produktmi krvného pôvodu zaobchádzajte ako s potenciálne infekčnými.
- **Varovanie týkajúce sa biologického rizika:** Etídiumbromid je potenciálny karcinogén. Pri jeho použití vždy noste ochranné rukavice, laboratórny plášť a ochranné okuliare.
- **Varovanie týkajúce sa biologického rizika:** Buďte opatrní pri používaní zdrojov UV žiarenia - noste vždy ochranné rukavice, laboratórny plášť a ochranné okuliare. Nikdy sa nepozerajte priamo do zdroja UV svetla.
- Karty bezpečnostných údajov sú k dispozícii na webovej stránke www.biofortuna.com.

7. Skladovanie a stabilita

Kity Biofortuna SSPGo skladujte pri teplote 4 – 30 °C. Hneď po vybratí PCR jamiek z obalu je potrebné reagencie rehydratovať pomocou vzorky do 3 hodín. Dátum expirácie je uvedený na obale. Po dátume uvedenom na obale produkt nepoužívajte.

Nepoužívajte súpravy, ktorých fóliový obal je natrhnutý alebo prepichnutý.

Zaistite, aby boli PCR jamky po nadávkovaní DNA tesne uzavreté, pretože by mohlo dôjsť k vyparovaniu počas PCR amplifikácie. Zvláštnu pozornosť venujte okrajom a rohom.

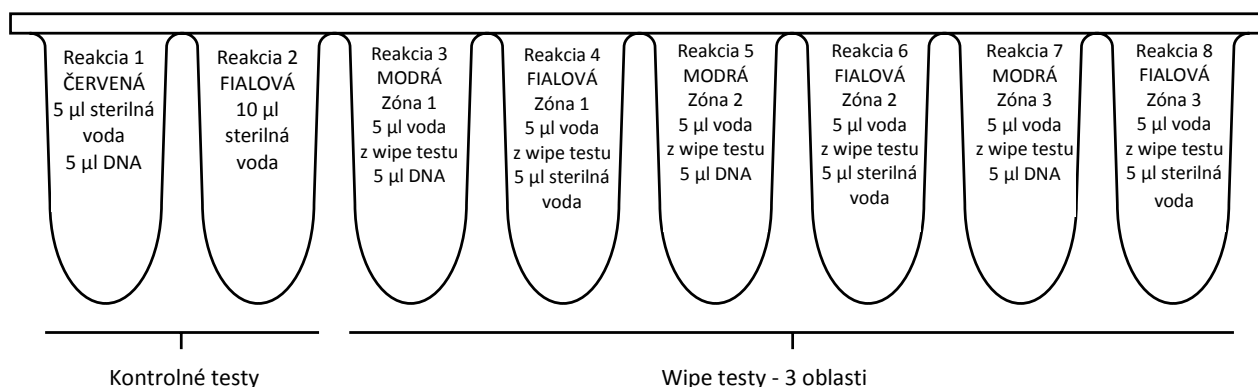
8. Pokyny pre používanie

Poznámka:

PCR pipety sú častým zdrojom kontaminácie a je vhodné otrieť špičku pipety vo vnútri nádoby, ak je to možné. Odporúča sa pri testoch kontaminácie používať pipetu, ktorá bola testovaná a prehlásená za negatívnu. Ak zistíte kontamináciu, odstráňte ju podľa pokynov pre odstránenie kontaminácie platných vo vašom laboratóriu a zóny otestujte znovu.

1. Na mieste, kde sa nepracuje s DNA, označte etiketou každú 2ml DNase-free sterilnú polypropylénovú skúmavku pre každú zónu určenú na testovanie wipe testom. Označte ďalšiu skúmavku ako negatívnu kontrolu.
2. Pipetou, ktorá bola prehlásená za nekontaminovanú, pridajte 500 µl sterilnej destilovanej vody pre molekulárno-biologické aplikácie do každej 2ml skúmavky.
3. Navlhčíte sterilnú vatovú tyčinku, ktorá je dodávaná v súprave, v každej skúmavke pre wipe test.
4. Otrite testovanú zónu navlhčeným aplikátorom.
5. Odlomte alebo odstrihnite plastovú nožičku a aplikátor vložte do pôvodnej 2ml skúmavky s vodou.
6. Krátko vortexujte.
7. Vyberte vatový aplikátor sterilnou pinzetou a zlikvidujte ho.
8. Centrifugujte v mikrocentrifúge 1 minútu pri 10 000 – 13 000 rpm, aby sa odstránili pevné častice.
9. Otvorte fóliový obal testu. Všetky testy je potrebné rehydratovať použitím celkovo 10 µl tekutiny (Obrázok 1).
10. **Negatívna kontrola:** Pridajte **10 µl** sterilnej vody pre molekulárno-biologické aplikácie do negatívnej kontroly v reakcii **2** (fialová).
11. Pridajte **5 µl** sterilnej vody do reakcií **1, 4, 6, 8**.
12. **Pozitívna kontrola:** Pridajte **5 µl** ľudskej genomickej DNA s koncentráciou 10 ng/µl do reakcie **1** (červená reakcia) a reakcií **3, 5 a 7** (modré).
13. **Reakcie wipe testu:** Pridajte **5 µl** centrifugovanej tekutiny (voda z wipe testu) z testovanej zóny 1 do reakcií **3 a 4**, z testovanej zóny 2 do reakcií **5 a 6**, a z testovanej zóny 3 do reakcií **7 a 8**.
14. Všetky reakcie majú po rehydratácii objem 10 µl (pozri Obrázok 1). Zatvorte reakcie dodanými uzávermi a pokračujte podľa zvyčajných parametrov PCR SSPGo uvedených nižšie.

Obrázok 1.



POZNÁMKA K RESUSPENZIÍ: Zaisťte, aby zmesi pre PCR reakciu boli resuspendované so vzorkami do 3 hodín od vybratia platne z obalu.

POZNÁMKA TÝKAJÚCA SA VÝŠKY PROFILU PLATNIČIEK/STRIPOV: Odporúča sa, aby výška profilu platničiek a stripov bola zhodná, ak sú umiestnené v rovnakom prístroji pre PCR reakciu. Rozdielne výšky profilov môžu mať za následok nedostatočný kontakt s vyhrievaným vekom prístroja pre PCR reakciu. Výsledkom môže byť nedostatočná amplifikácia PCR alebo jej zlyhanie.

Parametre PCR

Pre PCR je potrebné použiť nasledujúce parametre. Uistite sa, že rýchlosť stúpania/klesania je najmenej 1 °C za sekundu a zapnite vyhrievanie veka. Kompletný návod na použitie je uvedený v užívateľskej príručke výrobcu termocykléru. Termocykléry musia byť kalibrované podľa akreditačných pravidiel vydaných organizáciou American Society of Histocompatibility and Immunogenetic (ASHI) alebo European Federation of Immunogenetics (EFI).

Denaturácia	94 °C	po dobu 5 minút	
Denaturácia	96 °C	po dobu 15 sekúnd	← 10 cyklov
Anelácia	66 °C	po dobu 50 sekúnd	
Elongácia	72 °C	po dobu 30 sekúnd	
Denaturácia	96 °C	po dobu 15 sekúnd	← 20 cyklov
Anelácia	64 °C	po dobu 50 sekúnd	
Elongácia	72 °C	po dobu 30 sekúnd	

UDRŽIAVAJTE PRI TEPLOTE 15 °C

Gélová elektroforéza

Tieto pokyny aplikujte pri horizontálnej elektroforéze na agarózovom géle: Pripravte 2% agarózový gél v 0,5x TBE pufri. Keď je gél ochladený na približne 60 °C, pridajte etídiumbromid tak, aby konečná koncentrácia bola 0,5 µg/ml. Nalejte gél a vložte hrebene na vytvorenie mikrotitračných jamiek (napr. jamiek 12 x 8 s 9mm medzerami). Po stuhnutí vyberte hrebene a ponorte gél do roztoku 0,5x TBE pufri. Preneste 5 – 10 µl z každej reakcie platne alebo stripu do príslušnej jamky v géle a poznamenajte si pozíciu každej reakcie. Na určenie veľkosti môže byť vhodný 100 bp ladder (veľkostný marker). Elektroforetickú separáciu nechajte prebiehať 20 minút pri 10 V/cm.

Podrobnosti týkajúce sa špecifického vybavenia sú uvedené v návode na použitie od výrobcu vášho elektroforetického systému. Gél je potrebné zobrazíť pomocou UV dokumentačného systému pre gél s UV transiluminátorom.

9. Interpretácia

Výsledky pre testované zóny sú platné, iba ak je výsledok testovania pozitívnej kontroly pozitívny a výsledok testovania negatívnej kontroly negatívny.

Testy zón sú platné, iba ak je výsledok príslušného kontrolného inhibičného testu pozitívny.

Ak je prítomná kontaminácia PCR alebo kontaminácia DNA, bude pozorovaný amplikón s veľkosťou 187 bp.

Akékoľvek šmuhy alebo pružky rôznych veľkostí môžu tiež indikovať kontamináciu PCR, ale diméry primérov a ďalšie násobky primérov menšie ako 100 bp sú artefakty a mali by ste ich ignorovať.

Reakcia	Farbivo	Použitie	Výsledok	Záver	Postup
1	Červené	Pozitívna kontrola	Pozitívne na 187bp amplikón	Platný test. Vhodná DNA. Správny priebeh PCR	
			Bez amplifikácie	Neplatný test	Zopakujte celý postup s inou kontrolnou DNA
2	Fialové	Negatívna kontrola	Pozitívne na 187bp amplikón	Neplatný test. Kontaminovaná voda a/alebo pipeta	Otestujte s použitím inej vody a pipety
			Bez amplifikácie	Platný test. Nekontaminovaná voda	
3, 5, 7	Modré	Inhibičný test	Pozitívne na 187bp amplikón	Platný wipe test. Nie sú prítomné žiadne inhibítory	
			Bez amplifikácie	Neplatný wipe test. Sú prítomné potenciálne inhibítory	Vyčistite oblasť sterilnou vodou a test zopakujte
4, 6, 8	Fialové	Wipe Test	Pozitívne na 187bp amplikón	Je prítomná kontaminácia	Izolujte a vyčistite použitú pipetu. Vyčistite kontaminovanú oblasť roztokom pre odstránenie DNA. Zopakujte test.
			Bez amplifikácie	Negatívny wipe test. Bez kontaminácie	

10. Zariadenie a kontrola kvality

Testovanie metódy: Amplikón PCR z kitu Biofortuna sa sušil na pevnom povrchu. Wipe test sa uskutočnil s použitím neriedeného amplikónu a potom s použitím riedení v rozmedzí 1×10^1 až 1×10^{15} . Amplikón bol detegovaný v riedeniach do 1×10^{15} (vrátane).

Genomická DNA sa sušila na pevnom povrchu. Wipe test sa uskutočnil s použitím genomickej DNA s koncentráciou 100 ng/μl a potom s použitím riedení v rozmedzí 1×10^1 až 1×10^{15} . DNA bola detegovaná v riedeniach do 1×10^3 .

11. Literatúra

- 1) Bunce M et al Tissue Antigens. 1995 Nov;46(5):355-67.
- 2) Saiki RK et al. Nature. 1986 Nov 13-19;324(6093):163-6.

12. Biofortuna HLA Wipe Test (v2): Záznamový hárok pre vzorky

Záznamový hárok pre vzorky Pred použitím sa odporúča sa skopírovať tento záznamový hárok, keďže Wipe Test Kit obsahuje testy pre 36 zón (3 testované zóny na strip s 8 jamkami, 12 stripov v balení).

Dátum testu:

Testoval:









Schválil:

Ďalšie informácie:

Číslo šarže kitu:

Reakcia	Farbivo	Použitie (pozri Pokyny)	Výsledok testu	Postup	Informácie o vzorke
1	Červené	Pozitívna kontrola: DNA			
2	Fialové	Negatívna kontrola: Voda			
3	Modré	Zóna 1 inhibičný test			
4	Fialové	Zóna 1 wipe test			
5	Modré	Zóna 2 inhibičný test:			
6	Fialové	Zóna 2 wipe test			
7	Modré	Zóna 3 inhibičný test			
8	Fialové	Zóna 3 wipe test			

13. Vysvetlivky k používaným symbolom

	Počet testov
	Pozri návod na použitie
	Miesto výroby
	Diagnostické pomôcky <i>in vitro</i>
	Dátum expirácie
	Teplota skladovania
	Číslo šarže
	Katalógové číslo

14. Kontaktné údaje výrobcu

Biofortuna Ltd
 1 Hawkshead Road
 Croft Business Park
 Bromborough, CH62 3RJ, UK
 T: +44 (0) 151 334 0182
 E: info@biofortuna.com
 W: www.biofortuna.com

**15. Preklady**

Française :	Traductions disponibles
Deutsch:	Übersetzungen verfügbar
Español:	Traducciones disponibles
Italiano:	Traduzioni disponibili
Česky:	Překlady k dispozici
Dansk:	Tilgængelige oversættelser
Ελληνικά:	Διαθέσιμες μεταφράσεις
Magyar:	Fordítás rendelkezésre áll
Norsk:	Tilgjengelige oversettelser
Polski:	Tłumaczenia dostępne
Português:	Traduções disponíveis
Русский:	Переводы доступны
Slovensky:	Preklady k dispozícii
Türkçe:	Çeviriler mevcut
Svenska:	Översättningar tillgängliga

www.biofortuna.com

História revízie

Toto je verzia 2 dokumentu.
 Opravené pokyny v oddiele 8 a číslovanie oddielov.